



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 196 19 990 A 1**

21 Aktenzeichen: 196 19 990.5
22 Anmeldetag: 17. 5. 96
43 Offenlegungstag: 20. 11. 97

61 Int. Cl.⁶:
A 23 C 9/142
A 61 K 35/20
A 23 C 9/152
A 23 L 1/29
A 23 L 2/52
A 61 K 7/00
A 21 D 2/34
// A 23 C 3/00, 3/08

DE 196 19 990 A 1

71 Anmelder:
Adler, Charlotte, 94501 Aidenbach, DE; Achenbach,
Michael, 94501 Aidenbach, DE

74 Vertreter:
Kuhnen, Wacker & Partner, Patent- und
Rechtsanwälte, 85354 Freising

72 Erfinder:
gleich Anmelder

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE 43 37 654 A1
DE 27 33 851 A1
GB 22 89 278 A
US 48 97 456
EP 04 84 148 A1
EP 03 91 416 A1
EP 03 34 776 A2

EP 01 73 999 A2
WO 95 10 192 A1
WO 95 00 155 A1
WO 94 23 017 A1
WO 94 21 225 A1
WO 92 02 538 A1

STEPHAN, W., et.al.: Antibodies from Colostrum in
Oral Immunotherapy. In: J. Clin. Chem. Clin.
Biochem., Vol. 28, 1990, S. 19-23;
Chemical Abstract, Vol. 124, 1996, Ref. 37743z;
Derwent Abstracts: Ref. 93-152460/18 zu
WO 9308264-A1;
Ref. 18157 E/10 zu FR 2487-642;
Ref. 92-092984/12 zu J0 4036-299-A;
Ref. 86-070529/11 zu EP -173-999-A;
Ref. 89-339718/46 zu WO 8910-064-A;
Ref. 92-141526/18 zu AU 9182527-A;
BIOSIS COPYRIGHT 1996 BIOSIS, Ref. 92:102335;

54 Verfahren zur Herstellung von Kolostralmilchprodukten sowie deren Verwendung

57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines entkaseinierten Kolostralmilchproduktes, wobei Rohkolostrum entfettet wird, derart angesäuert wird, daß Kasein in Lösung bleibt und eine Ultrafiltration mit einer Ausschlußmolekularmasse von mindestens 10 Da durchgeführt wird. Das erfindungsgemäße erhaltene Kolostralmilchprodukt eignet sich besonders als Zusatz für Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel, Getränke, Kindernahrung, Tierernährung als Getränke im Intensivsportbereich zum Muskelschutz beziehungsweise zur Abkürzung der muskulären Erholungsphase sowie zur Prophylaxe und der Therapie von bakteriellen, viralen und mykotischen Infektionen.

DE 196 19 990 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 09. 97 702 047/385

13/28

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung entkaseinierter Kolostralmilchprodukte gemäß Anspruch 1, ein Kolostralmilchprodukt gemäß Anspruch 10, ein Getränk, welches Kolostralmilchprodukt
 5 enthält gemäß Anspruch 15, sowie die Verwendung von Kolostralmilchprodukten gemäß den Ansprüchen 16 und 17.

Es ist seit längerem bekannt, daß das Kolostrum — also die Vormilch — aller Säugetiere, einschließlich des Menschen, wertvolle Bestandteile enthält, die die Neugeborenen vor Infektionen schützen und weitere günstige
 10 Wirkungen aufweisen.

So beschreibt beispielsweise die EP-A-0 173 999 ein Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinen aus Rinder- oder Humankolostralmilch, wobei eine Immunglobulinfraktion aus Rinder- oder Humankolostralmilch
 15 gewonnen wird, die sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin zur Behandlung oder Prophylaxe von bakteriellen und viralen Darminfektionen geeignet ist.

So hat sich beispielsweise herausgestellt, daß die Kolostralimmunglobuline gegen die Bakterien: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Staphylokokken*, *Enterokokken* und *Streptokokken* sowie gegen die
 20 Viren: *Varicellavirus*, *Cytomegalievirus*, *Rubellavirus*, *Herpesvirus* und *Rotavirus* wirksam waren.

Hergestellt wurde eine derartige Kolostralglobulinfraktion durch Aufarbeiten von Kolostralmilch unter Ausfällen der Kaseine bei einem pH-Wert von 4,0 bis 5,5 und anschließendem Abfiltrieren des Kaseinkuchens
 25 durch Tangentialfiltration und nachfolgender Ultrafiltration mit einer Trenngrenze von 5000 bis 80 000 Dalton.

Da der Keimgehalt in der rohen Kolostralmilch bei 106 bis 108 Keimen pro Milliliter liegen kann, beschäftigt sich die EP-A-0 471 890 mit einem Verfahren zur Gewinnung einer sterilfiltrierten, kaseinhaltigen Kolostral-
 30 milch, bei welchem das Rohkolostrum soweit angesäuert wird, daß das zunächst ausfallende Kasein wieder in Lösung geht und die erhaltene Lösung anschließend sterilfiltriert wird.

Dabei geht die Lehre der EP-A-0 471 890 davon aus, daß das Kasein selbst günstige therapeutisch anwendbare
 35 Eigenschaften hat, die besonders die Wirkung der Immunglobuline bei gastrointestinalen Störungen unterstützen. Gemäß diesem Stand der Technik werden beispielsweise aus dem Kasein opiatartige Wirkstoffe freigesetzt, die zur Hemmung der Darmbewegung und Förderung der Elektrolyt- und Wasserresorption führen. Daher ist es nach der Lehre der EP-A-0 471 890 wünschenswert, die Kolostralmilch möglichst wenig in ihrer
 40 Proteinzusammensetzung zu verändern, da sie geradezu optimal für die Prophylaxe und Therapie von gastrointestinalen Infektionen und Störungen zusammengesetzt ist.

Darüber hinaus beschreibt die WO 95/10192 ein Nährgetränk, auf Kolostrumbasis, welches die körperliche
 45 Leistungsfähigkeit und Erholung verbessert.

Ein derartiges Getränk wird hergestellt durch Entfetten des Kolostrums und anschließender Fällung und
 50 Abfiltrieren des Kaseins und Sterilfiltrieren der erhaltenen Kolostrummolke.

Ein derartiges Kolostralmilchprodukt hat jedoch den Nachteil, daß aufgrund der Kaseinpräzipitation viele
 55 günstige Bestandteile des Kolostrums wie etwa der Gehalt an Wachstumsfaktoren, beispielsweise IGF-1, IGF-2 oder TGF- β vermindert ist und daher die Ausbeute eines derartigen Kolostralmilchproduktes bezogen auf das Rohkolostrum nur dürtig ausfällt, ja bisweilen bestimmte Wachstumsfaktoren wie IGF-2 und TGF- β überhaupt
 60 nicht mehr nachgewiesen werden können.

Ausgehend von diesem Stand der Technik war es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren
 65 zur Verfügung zu stellen, welches die Herstellung eines weitgehend entkaseinierten Kolostralmilchproduktes erlaubt, welches insbesondere die im Kolostrum enthaltenen Wachstumsfaktoren möglichst quantitativ enthal-

Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt in verfahrenstechnischer Hinsicht durch die Merkmale des Anspruchs 1,
 70 bezüglich eines Produktes durch die Merkmale der Ansprüche 10 und 15, und verwendungstechnisch durch die Merkmale der Ansprüche 16 und 17.

Dadurch, daß das Kasein derart angesäuert wird, daß es in Lösung bleibt und anschließend eine Ultrafiltration
 75 mit einer Ausschlußmolekularmasse von ca. 106 Dalton durchgeführt wird, wird einerseits das Rohkolostrum von Kasein befreit. Dies ist insbesondere für Allergiker und für Neurodermitiker erwünscht, da Kasein für diesen
 80 Personenkreis unerwünschte Nebenwirkungen haben kann. Andererseits erreicht man überraschenderweise durch die Ultrafiltration einen Gehalt von bis zu ca. 95% bezogen auf den Gehalt des Rohkolostrums an
 85 Wachstumsfaktoren, insbesondere an IGF-1.

Es ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren insbesondere überraschend, daß Kasein bei einer Molekular-
 90 masse von ca. $150 \cdot 10^6$ Dalton und mit seiner riesigen Oberfläche im Wege einer Ultrafiltration abgetrennt werden kann, wobei die erwünschten niedermolekularen Bestandteile des Kolostrums, wie z. B. Wachstumsfak-
 95 toren und Peptide, nahezu quantitativ in das Filtrat übertreten — also ohne an die riesige Proteinoberfläche des Kaseins gebunden zu werden.

Ein mittels des erfindungsgemäßen Verfahren hergestelltes Kolostralmilchprodukt ist für viele Anwendungen
 100 im therapeutischen und Lebensmittelergänzungsbereich nützlich. So hat sich beispielsweise bei der Untersu-
 105 chung von Hochleistungssportlern ergeben, daß die Kreatinkinase im Serum, ein Indikator für die körperliche Belastung, signifikant niedriger ist, wenn die Probanden das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt in fester
 110 oder flüssiger Form eingenommen hatten, sowohl regelmäßig über einen längeren Zeitraum oder unmittelbar vor starker körperlicher Beanspruchung.

Zu diesem Mechanismus ist zu sagen — ohne hierauf beschränkt zu sein, — daß die Kreatinkinase immer dann
 115 von Muskelzellen freigesetzt wird, wenn Muskelzellen in irgendeiner Form geschädigt sind. Eine derartige
 120 Schädigung tritt beispielsweise nach extremen körperlichen Belastungen auf, oder auch bei pathologischen Erscheinungsbildern wie beispielsweise Herzinfarkt oder Muskelerkrankungen. Mittlerweile ist in mehreren
 125 Studien gezeigt worden, darunter eine Doppelblindstudie während der Olympischen Winterspiele in Lilleham-

mer mit dem finnischen Skiteam, daß Kolostrummilchprodukte die Konzentration der freien Kreatinkinase im Serum um 30 bis 40 Prozent erniedrigen, wodurch die Leistungsfähigkeit signifikant länger erhalten bleibt und sich die Regenerationszeit, also das Refraktärstadium der Muskulatur, merklich verkürzt.

Desweiteren ist aus in vitro-Studien bekannt, daß das Kolostrum die Lebensfähigkeiten und das Wachstum verschiedener Zelltypen in der Zellkultur unterstützt, da es im wesentlichen vier Hauptfraktionen aufweist, nämlich:

eine Wachstumsfaktorfraktion, eine Immunglobulinfraktion, eine Enzymproteinfraktion sowie eine Vitamin- und Peptidfraktion.

Es ist ferner aus Untersuchungen des Kolostrums bekannt, daß diese wesentlichen Bestandteile des Kolostrums im wesentlichen bei der Geburt des Kalbes ihren Höhepunkt erreichen und bereits 6—12 Stunden nach der Geburt bereits schon über die Hälfte ihres Gehaltes an wesentlichen Bestandteilen verloren hat und danach über die nächsten Tage stetig abfällt, wobei nach 3—4 Tagen nur noch Spuren vorhanden sind.

Es hat sich ferner herausgestellt, daß Kolostrumprodukte ohne weiteres bei sportlichen Veranstaltungen den Athleten gegeben werden können, da sie keinerlei Dopingsubstanzen enthalten.

Darüber hinaus hat sich herausgestellt, daß das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt als Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel oder Kosmetikum sowie als Zusatz für Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel, Getränke oder Kosmetika eingesetzt werden kann.

Neben der Anwendung im Sport- und Extremsportbereich haben sich überragende therapeutische Erfolge bei der Behandlung der Neurodermitis ergeben. Hierzu wurde das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt bevorzugt in Liposomen eingeschlossen und zu einer Cremegrundlage gemischt und auf die betroffenen Hautpartien der an Neurodermitis leidenden Patienten aufgebracht.

Zusätzlich wurde das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt in Form eines Getränkes verabreicht.

Das Patientenkollektiv umfaßte 20 an Neurodermitis leidende Personen im Erwachsenenalter, die an neurodermitischen Erscheinungen, insbesondere auch in den Ellenbogen, litten. Die Patienten nahmen keinerlei Medikamente ein, sondern behandelten die betroffenen Hautareale mit einer Liposomencreme, deren Liposomen das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt enthielten. Die Konzentration der Liposomen in der Cremegrundlage (z. B. Soja-Öl, Tegomuls, Vitamin E + A, Cholesterol, HSA, Contrex, Carotin DF + HF, Orangenblüten-Öl, Melissen-Öl, Mandarinen-Öl, Neroli-Öl, Aqua dest.) betrug ca. 0,1 ml/g oder 10% Liposomen.

Die Behandlung wurde 14 Tage lang durchgeführt und dann vom behandelnden Arzt begutachtet. Hierbei stellte sich heraus, daß 18 von 20 Patienten einen nahezu 90-prozentigen Rückgang der neurodermitischen Hauterscheinungen aufwiesen. Sowohl die Liposomencreme als auch das oral verabreichte Kolostralmilchprodukt-Getränk wurden dann für 14 Tage abgesetzt und die neurodermitischen Exantheme erneut ärztlich begutachtet. Es stellte sich dann heraus, daß sämtliche Patienten mit überwiegendem Zurückgehen der Hautsymptome nach der ersten Kolostralmilchprodukt-Behandlungsperiode jetzt wieder an deutlichem neurodermitischen Ekzem litten.

Hierauf wurde erneut eine Behandlungsperiode von 14 Tagen angesetzt, während dieser die betroffenen Hautpartien erneut mit der Liposomencreme, die das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt in Liposomen eingeschlossen enthält, behandelt wurde und unterstützend 10 ml pro Tag eines Kolostralmilchprodukt-Getränkes verabreicht und die Hauterscheinungen erneut ärztlich begutachtet wurden.

Hierbei stellte sich heraus, daß 17 von 20 Probanden, die an der Studie teilnahmen, wieder einen deutlichen Rückgang des neurodermitischen Ekzems aufwiesen.

Aus dieser Cross-over-Studie ist klar erkennbar, daß die Besserung der neurodermitischen Hauterscheinung auf das applizierte, erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt zurückzuführen ist.

Erste Studien über einen längeren Zeitraum von ca. 6 Monaten zeigen auch, daß das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt, vorzugsweise in Form eines Dermatikums, insbesondere einer Creme, Lotion oder Salbe als Langzeittherapeutikum für die Hauterscheinungen der Neurodermitis geeignet ist.

Es wurde darüber hinaus eine Kontrollstudie mit Placebo-Liposomencreme durchgeführt, wobei die Cremegrundlage dieselbe war wie in der Versuchsgruppe, wobei die Liposomen jedoch lediglich physiologische Kochsalzlösung enthielten. Als Zusatzgetränkgabe wurde entkaseinierte Milch statt der erfindungsgemäßen Kolostralmolke verabreicht.

Innerhalb der Kontrollgruppe von 15 Probanden mit neurodermitischen Hauterscheinungen zeigten lediglich zwei signifikante Besserungen der Hauterscheinungen nach einem 14-tägigen Behandlungsintervall.

Durch dieses placebokontrollierte Experiment ist die Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Kolostralmilchproduktes weiter gesichert.

Neben der bereits erwähnten ausdauersteigernden Wirkung und der günstigen Wirkung auf die Erholungsphase der Muskulatur und der oben nachgewiesenen Wirkung bei Neurodermitis, läßt sich das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt auch noch einsetzen als Bestandteil von Babynahrung, diätetischer Nahrung, klinischer Nahrung, insbesondere Sondennahrung, sowie bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Allergien, insbesondere Heuschnupfen, Pollenallergien, Herzinfarkten und muskulären Erkrankungen während der Rehabilitation. Diese Wirkungen zeigen sich insbesondere an der Senkung der Kreatinkinase, was eine Indikation für eine Erholungsphase der Muskulatur ist.

Ferner hat das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt auch günstige Wirkung zur Prophylaxe und Unterstützung viraler, bakterieller und mykotischer Infektionen sowie generell zur Unterstützung und Stärkung des Immunsystems, was sich durch den erhöhten Gehalt an Immunglobulinen, insbesondere IgG, IgA, IgE und IgM erklärt. Weiterhin spielt auch das TGF- β eine nicht unwichtige Rolle im Immunsystem, da TGF- β auf die β -Lymphozyten wirkt und einen Switch von IgE zu IgA bewirkt und eine Wirkung auf die Immunstimulanz hat.

Darüber hinaus hat sich herausgestellt, daß das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt auch günstige Auswirkungen auf die Wundheilung hat, insbesondere bei postoperativer Nachsorge oder auch kleineren

Verletzungen, bei oraler und zusätzlich lokaler topischer Anwendung.

Die Unteransprüche stellen bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar.

Weitere Vorteile und Merkmale ergeben sich anhand der Beschreibung von Ausführungsbeispielen.

Beispiel 1

20 Liter entfettete Rinderkolostralmilch, die in den ersten 24 Stunden nach der Geburt des Kalbes gewonnen wurden, wurden bei +4°C durch Zugabe von 60 mMol EDTA und anschließend von 365 ml HCl auf pH 2,54 gebracht. Diese pH-abgesenkte Rinderkolostralmilch wurde im Anschluß bei einer Ausschlußmolekularmasse von 1 000 000 Da ultrafiltriert, wobei die Temperatur konstant bei +4°C bis +8°C gehalten wurde. Es wurde dabei ein Filtermodul der Firma Millipore 1000 KD aus Zelluloseacetat wegen seiner geringen Proteinbindung verwendet. Es wurden dabei 10 L Permeat gewonnen.

Die Ausbeute betrug bei dieser Vorgehensweise 50%. Nach der Ultrafiltration wurde das klare Permeat mit 250 ml NaOH auf pH 6,2 angehoben. Die dabei entstandene leichte Trübung wurde durch Zentrifugation beseitigt. Das nun klare Permeat wurde mit 10 L Aqua dest. verdünnt und einer weiteren Ultrafiltration mit einer Ausschlußmolekularmasse von 1000 Da unterzogen, um das bei der pH-Absenkung und anschließenden pH-Anhebung entstandene Salz zu entfernen. Dies hat auch eine gleichzeitige Entzuckerung zur Folge. Wiederum wurde das Rinderkolostralmilchprodukt konstant bei einer Temperatur von +4°C bis +8°C gehalten und solange ultrafiltriert, bis die Ausgangsmenge von 10 Liter Retentat erreicht wurde. Dieses Retentat wurde nach herkömmlicher Methode bei 0,22 µm sterilfiltriert. Es mußten keine Vorfilter verwendet werden. Das Produkt war leicht sterilfiltrierbar. Im Anschluß wurde eine Analyse erstellt.

Das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene Kolostralmilchprodukt hatte die folgende analytisch erfaßte Zusammensetzung gemäß Tab. 1.

Besonders auffallend ist der hohe Anteil an Immunglobulinen und Wachstumsfaktoren, insbesondere IGF-1.

Ein derartiges Kolostralmilchprodukt kann direkt als Getränk verwendet werden oder kann zu unterschiedlichen Nahrungsmitteln zugesetzt werden, so beispielsweise auch zu Backwaren, insbesondere zu energiereichen Riegeln, bevorzugt zu sogenannten Powerbars. Der Zusatz zu Backwaren oder Riegeln erfolgt bevorzugt nach einer Sprühtrocknung oder einer Gefriertrocknung.

Tabelle 1

Energiegehalt: 80,0 kJ/100g pH: 6,16
Osmolarität: 264,0 mOsm/kg
Gesamtprotein: 0,3 g/l
Trockensubstanz: 5,24 g/l
Asche: 0,68 mg/100 ml
Laktose: 0,2 mg/100 ml
Glukose: 10,0 mg/100 ml
Gesamtkohlenhydrate: 20,0 g/l
Fett: < 0,03 mg/100 ml

VITAMINE

Vitamin A: < 150,0 µg/100 ml
Thiamin (Vit. B1): 63,5 µg/100 ml
Riboflavin (Vit. B2): 620,0 µg/100 ml
Pyridoxin (Vit. B6): 3500,0 µg/100 ml
Cobalamin (Vit. B12): 0,034 µg/100 ml
Folsäure: 2,65 µg/100 ml
Vitamin C: 270,0 µg/100 ml
Cholecalciferol (Vit. D3): 0,28 µg/100 ml
Tocopherol (Vit. E): 30,0 µg/100 ml
Vitamin K: 0,054 µg/100 ml
Ubichinon (Vit. Q10): 5,4 µg/100 ml

IONEN

Natrium (Na): 943,7 mg/l
Kalium (K): 1883,5 mg/l
Kalzium (Ca): 490,52 mg/l
Magnesium (Mg): 147,98 mg/l
Eisen (Fe): 0,02 mg/l
Kupfer (Cu): 0,004 mg/l
Zink (Zn): 0,30 mg/l
Chrom (Cr): 0,0014 mg/l
Phosphor (P): 498,0 mg/l
Selen (Se): 0,018 mg/l

DE 196 19 990 A1

ORGANISCHE MOLEKÜLE

Kreatinin: 17,2 mg/l

FREIE AMINOSÄUREN

5

Alanin: 6,60 mg/l
Arginin: 0,0056 mg/l
Tryptophan: 2,66 mg/l
Cystin: < 0,27 mg/l
Methionin: 1,03 mg/l
Phosphoserin: 1,05 mg/l
Taurin: < 0,363 mg/l
Phosphoethanolamin: 7,31 mg/l
Asparaginsäure: 4,85 mg/l
Threonin: 0,00014 mg/l
Serin: 4,85 mg/l
Glutaminsäure: 9,44 mg/l
Glutamin: 7,99 mg/l
Prolin: 7,37 mg/l
Glycin: 4,85 mg/l
Alanin: 6,6 mg/l
Citrullin: 1,05 mg/l
Valin: 11,13 mg/l
Isoleucin: 4,85 mg/l
Leucin: 9,44 mg/l
Tyrosin: 3,26 mg/l
Phenylalanin: 4,95 mg/l
 β -Alanin: < 0,27 mg/l
 β -Aminoisobuttersäure: 1,03 mg/l
Ornithin: 0,53 mg/l
Lysin: 7,99 mg/l

10

15

20

25

30

IMMUNGLOBULINE

IgG: 98,0 mg/100 ml
IgA: 3,0 mg/100 ml
IgM: 2,0 mg/100 ml
IgE: 0,026 μ g/100 ml

35

40

NATÜRLICHE WACHSTUMSFAKTOREN

IGF-1 (Somatomedin C): 380,0 ng/ml
IGF-2: 242,0 ng/ml
TGF- β : 35,0 ng/ml

45

Beispiel 2

Es wurde bei der pH-Absenkung, Ultrafiltration, pH-Anhebung und Zentrifugation wie in Beispiel 1 verfahren. Danach wurden, um die Ausbeute zu vergrößern 10 L Aqua dest. hinzugefügt, die vorher ebenfalls auf pH 2,54 gebracht wurden. Die Ultrafiltration wurde fortgesetzt und es wurden nochmals 10 L Permeat gewonnen. Dieses Permeat wurde zusammen mit dem Permeat der 1. Ultrafiltration, und zusätzlich 10 Litern Aqua dest. mit einer Ausschlußmolekularmasse von 500 Da ultrafiltriert, wobei eine Ultrafiltrationsmembran der Firma Amicon verwendet wurde. Auch hier wurde die Temperatur konstant auf +4°C bis +8°C gehalten. Es wurde so lange ultrafiltriert, bis 15 L Retentat übrig blieben. Dadurch konnte die Ausbeute auf 75% erhöht werden. Dieses Retentat wurde nach herkömmlicher Methode bei 0,22 μ m sterilfiltriert. Es mußten keine Vorfilter verwendet werden. Das Produkt war leicht sterilfiltrierbar. Im Anschluß wurde eine Analyse erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

50

55

Vergleichsbeispiel 1

60

20 L entfettete Kolostralmilch wurden leicht erwärmt (ca. 38°C) und mit 240 ml HCl auf pH 4,5 abgesenkt. Dabei verklumpte das Kasein und war mit einem Sieb und einer anschließenden Zentrifugation leicht zu entfernen. Eine Trübung der Molke war dabei nicht zu verhindern. Anschließend wurde die Molke mit einer Ausschlußmolekularmasse von 1 000 000 Da ultrafiltriert, wobei ein Modul der Firma Millipore verwendet wurde. Es wurden 7 L Permeat gewonnen, die mit 80 ml NaOH auf pH 6,2 gebracht wurden. Es entstand wieder eine leichte Trübung, die mit einer Zentrifugation entfernt werden konnte. Das Permeat wurde nach herkömmlicher Methode bei 0,22 μ m sterilfiltriert. Es mußten keine Vorfilter verwendet werden. Das Produkt war leicht

65

sterilfiltrierbar. Im Anschluß wurde eine Analyse erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 2

20 L entfettete Kolostralmilch wurden leicht erwärmt (ca. 38°C) und mit 240 ml HCl auf pH 4,5 abgesenkt. Dabei verklumpte das Kasein und war mit einem Sieb und einer anschließenden Zentrifugation leicht zu entfernen. Anschließend wurde der pH mit 100 ml NaOH wieder auf pH 6,2 gebracht und mit einer Ausschlußmolekularmasse von 1 000 000 Da ultrafiltriert, wobei ein Modul der Firma Millipore verwendet wurde. Es wurde 7 L Permeat gewonnen. Diese wurden im Anschluß nach herkömmlicher Methode bei 0,22 µm sterilfiltriert. Es mußten keine Vorfilter verwendet werden. Das Produkt war leicht sterilfiltrierbar. Im Anschluß wurde eine Analyse erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 3

20 L entfettete Kolostralmilch wurden bei +4°C bis +8°C mit 240 ml HCl auf pH 4,5 abgesenkt. Hierbei wurde festgestellt, daß das Kasein nur unzureichend verklumpte. Es konnte keine richtige Molke gewonnen werden. Das geronnene Kasein wurde abzentrifugiert und die restliche Milch wurde mit einer Ausschlußmolekularmasse von 1 000 000 Da ultrafiltriert, wobei ein Modul der Firma Millipore verwendet wurde. Das dabei entstandene Permeat (8,5 L) wurde mit 100 ml NaOH auf pH 6,3 gebracht und die Trübung wurde wiederum abzentrifugiert. Das Permeat wurde im Anschluß nach herkömmlicher Methode bei 0,22 µm sterilfiltriert. Es mußten keine Vorfilter verwendet werden. Das Produkt war leicht sterilfiltrierbar. Im Anschluß wurde eine Analyse erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 4

20 L entfettete Kolostralmilch wurden ohne Vorbehandlung direkt bei einer Ausschlußmolekularmasse von 1 000 000 Da ultrafiltriert, wobei ein Modul der Firma Millipore verwendet wurde. Es wurden 10 L Permeat gewonnen. Diese wurden im Anschluß nach herkömmlicher Methode bei 0,22 µm sterilfiltriert. Es mußten keine Vorfilter verwendet werden. Das Produkt war leicht sterilfiltrierbar. Im Anschluß wurde eine Analyse erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Bei dem Beispiel 2 und den Vergleichsbeispielen wurden nur die IGF-1- und die TGF-β-Konzentrationen und das Immunglobulin G bestimmt, die folgende Werte enthielten:

Tabelle 2

	IGF-1 (ng/ml)	TGF-β (ng/ml)	IgG (mg/100 ml)
Beispiel 2	371	30	87
Vergleichs- beispiel 1	81	Spuren	43
Vergleichs- beispiel 2	48	nicht nachweisbar	25
Vergleichs- beispiel 3	63	nicht nachweisbar	35
Vergleichs- beispiel 4	23	nicht nachweisbar	15

Aus diesen Ergebnissen ergab sich eindeutig, daß eine pH-Absenkung mit anschließender Ultrafiltration, ohne daß der pH-Wert vor der Ultrafiltration wieder angehoben wird bessere Ergebnisse zeigt, als z. B. eine Ultrafiltration ohne pH-Absenkung. Es ergab sich ferner, daß eine pH-Absenkung auf ca. 4,5 ebenfalls kein zufriedenstellendes Ergebnis bringt, da sowohl bei pH 4,5 nicht alle Proteine in Lösung gehen, als auch bei der Entfernung des geronnenen Kaseins viele wertvolle Proteine mitgerissen werden. Weiterhin spielt die Temperatur ebenfalls eine wichtige Rolle, da eine Erhöhung der Temperatur eine Ultrafiltration nicht möglich macht, da das Kolostrum dabei verdickt.

Lediglich die in Beispiel 1 und 2 angegebenen Verfahren zeigten zufriedenstellende Ergebnisse.

Vergleichsbeispiel 5

Zum weiteren Vergleich mit einem Produkt gemäß der vorliegenden Erfindung wurde von denselben Aus-

gangsmengen an Rohkolostrum wie in Beispiel 1 ausgegangen und wie oben beschrieben entfettet, das entfettete Rohkolostrum wurde dann jedoch auf einen pH-Wert von ca. 4,5 eingestellt und über einen Mikrofilter mit einer Porengröße von ca. 5 µm abgetrennt. Das erhaltene Molkefiltrat wurde dann mittels Zugabe von Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von ca. 7 eingestellt und anschließend steril filtriert.

Die Analyse eines derartigen Kolostralmilchproduktes gemäß dem Stand der Technik ist in Tabelle 3 gezeigt. 5

Ein Vergleich der Wachstumsfaktorenfraktion zeigt einen etwa um 100% niedrigeren Gehalt an IGF-1 und nicht meßbare Werte an IGF-2 und TGF-β. Das erfindungsgemäße Kolostralmilchprodukt hat somit einen signifikant höheren Gehalt an den für die günstigen pharmakologischen und vitalen Wirkungen erforderlichen Wachstumsfaktoren und weist ferner einen deutlich höheren Immunglobulingehalt auf. 10

Vergleichsbeispiel 5

Tabelle 3

Energiegehalt: 80,0 kJ/100 g	15
pH: 6,55	
Osmolarität: 418,0 mOsm/kg	
Gesamtprotein: 0,43 g/100 ml	
Trockensubstanz: 5,24 g/100 ml	
Asche: 0,82 g/100 ml	20
Laktose: < 0,5 g/100 ml	
Glukose: 1,91 g/100 ml	
Gesamtkohlenhydrat: 4,0 g/100 ml	
Fett: < 0,02 g/100 ml	
IgG: 0,039 g/100 ml	25

VITAMINE

Thiamin (Vit. B1): 40,0 µg/100 ml	
Riboflavin (Vit. B2): 180,0 µg/100 ml	30
Pyridoxin (Vit. B6): 12,0 µg/100 ml	
Cobalamin (Vit. B12): 0,041 µg/100 ml	
Folsäure: 4,2 µg/100 ml	
Nicotinamid: 83,0 µg/100 ml	
Panthotensäure: 300,0 µg/100 ml	35

IONEN

Natrium (Na): 1498,9 mg/l	
Kalium (K): 1599,2 mg/l	40
Kalzium (Ca): 280,15 mg/l	
Magnesium (Mg): 109,88 mg/l	
Eisen (Fe): < 0,22 mg/l	
Kupfer (Cu): < 0,05 mg/l	
Mangan (Mn): < 0,05 mg/l	45
Zink (Zn): < 0,05 mg/l	
Chrom (Cr): < 0,01 mg/l	
Phosphor (P): 480,0 mg/l	
Selen (Se): 0,002 mg/l	50

ORGANISCHE MOLEKÜLE

Kreatinin: 34,4 mg/l	
Kreatin: 127,0 mg/l	55

FREIE AMINOSÄUREN

Arginin: 5,6 mg/l	
Tryptophan: < 6,1 mg/l	
Cystin: < 0,7 mg/l	60
Methionin: 1,0 mg/l	
Phosphoserin: 9,06 mg/l	
Taurin: 115,0 mg/l	
Phosphoethanolamin: 27,37 mg/l	
Asparaginsäure: 2,66 mg/l	65
Threonin: 3,1 mg/l	
Serin: 5,04 mg/l	
Glutaminsäure: 37,0 mg/l	

Glutamin: 7,31 mg/l
 Prolin: 7,37 mg/l
 Glycin: 4,85 mg/l
 Alanin: 6,6 mg/l
 5 Citrullin: 1,05 mg/l
 Valin: 11,13 mg/l
 Isoleucin: 4,85 mg/l
 Leucin: 9,44 mg/l
 Tyrosin: 3,26 mg/l
 10 Phenylalanin: 4,95 mg/l
 β-Alanin: < 0,27 mg/l
 β-Aminoisobuttersäure: 1,03 mg/l
 Ornithin: 0,53 mg/l
 Lysin: 7,99 mg/l
 15 Histidin: 1,4 mg/l

NATÜRLICHE WACHSTUMSFAKTOREN

IGF-1 (Somatomedin C): 70,0 ng/ml
 20 IGF-2: nicht erfaßbar
 TGF-β: nicht erfaßbar.

Beispiel 3

25 Das Kolostralmilchprodukt gemäß Beispiel 1 wird nach bekannten Verfahren in Liposomen eingeschlossen und in eine Cremegrundlage (im Beispielfalle Soja-Öl, Tegomuls, Vitamin E + A, Cholesterol, HSA, Contrex, Carotin DF + HF, Orangenblüten-Öl, Melissen-Öl, Mandarinen-Öl, Neroli-Öl und Aqua dest. mit einem Liposomengehalt von 0,1 ml/g (10%)) eingebracht.

Eine derartige Liposomencreme wurde verwendet, um ihre Einwirkungen auf die Wundheilung und auf 30 neurodermitische Ekzeme zu untersuchen.

Wie bereits eingangs beschrieben, zeigte sich eine signifikante Besserung des gesamten dermatologischen Erscheinungsbildes der Neurodermitis in einer placebokontrollierten Cross-over-Studie, wobei in der Versuchsgruppe 20 Probanden teilnahmen und in der Kontrollgruppe 15 Probanden teilnahmen.

Somit steht mit der vorliegenden Erfindung erstmals ein Verfahren zu Verfügung, mit dem es möglich ist, die 35 wichtigsten Bestandteile der Kolostralmilch nahezu quantitativ in ein Kolostralmilchprodukt zu überführen, welches dann hohe Gehalte an Wachstumsfaktoren und Immunglobulinen aufweist.

Selbstverständlich ist es möglich, gezielte Fraktionen, beispielsweise immunglobulinangereicherte Fraktionen und/oder Wachstumsfaktorfraktionen zu erhalten, die dann gegebenenfalls separat entweder oral appliziert werden können oder jedoch in Liposomen eingeschlossen werden können und dann in Form von Cremes, Pasten 40 oder Salben oder Emulsionen auf die Haut aufgetragen werden können.

Erreicht wird eine derartige Fraktionierung des erfindungsgemäßen Kolostralmilchproduktes durch weitere Ultrafiltrationen mit definierten Ausschlußmolekularmassen von 300 kDa und/oder 150 kDa und/oder 100 kDa und/oder 50 kDa und/oder 30 kDa und/oder 20 kDa und/oder 10 kDa und/oder 5 kDa und/oder 1 kDa und/oder 0,5 kDa.

45 Weiterhin kann es vorteilhaft sein, den pH vor einer weiteren Fraktionierung wieder anzuheben, wenn man z. B. eine Entsalzung bei 1 kDa oder 0,5 kDa vornimmt, um die Moleküle wieder so groß zu machen, daß sie nicht mit durch den Filter gehen. Ob eine pH-Anhebung durchgeführt werden sollte oder nicht, hängt also weitgehend davon ab, was man mit weiteren Fraktionierungen erreichen will.

50 Welche Ausschlußmolekularmasse der Fachmann wählt, hängt ebenfalls davon ab, welche weiteren Fraktionen er aus dem erfindungsgemäßen Kolostralmilchprodukt erhalten möchte.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines wenigstens weitgehend entkaseinierten Kolostralmilchproduktes, wobei 55 Rohkolostrum entfettet wird; derart angesäuert wird, daß Kasein in Lösung bleibt; und eine Ultrafiltration mit einer Ausschlußmolekularmasse von ca. 10⁶ Da durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das erhaltene Produkt mit weiteren Ultrafiltrationsschritten in unterschiedliche Molekularmassenbereiche fraktioniert.

60 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die weiteren Ultrafiltrationsschritte mit einer Ausschlußmolekularmasse von 300 kDa und/oder 150 kDa und/oder 100 kDa und/oder 50 kDa und/oder 30 kDa und/oder 20 kDa und/oder 10 kDa und/oder 5 kDa und/oder 1 kDa und/oder 0,5 kDa, durchführt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man den pH-Wert nach dem 65 ersten Ultrafiltrationsschritt und nach den weiteren Ultrafiltrationsschritten auf den pH-Wert des Rohkolostrums, insbesondere auf einen pH von ca. 5,9 bis 7,4, vorzugsweise ca. 6 bis 6,5, einstellt.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zum Ansäuern und/oder zur pH-Einstellung Salzsäure, Phosphorsäure, Milchsäure und/oder Zitronensäure verwendet.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die jeweils erhaltenen Produkte, insbesondere durch reverse Osmose, durch Ultrafiltration mit ca. 1 kDa oder ca. 0,5 kDa und/oder durch Dialyse entsalzt.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Produkte entzuckert, wobei enzymatisch und/oder über Ultrafiltration entzuckert wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man dem erhaltenen Produkt Additive, insbesondere Vitamine, Aromastoffe, Geschmacksverbesserer, Konservierungsstoffe usw. zusetzt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die erhaltenen Produkte sterilisiert, insbesondere sterilfiltriert.
10. Wenigstens weitgehend entkaseiniertes Kolostralmilchprodukt, dadurch gekennzeichnet, daß es nach einem Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 9 erhältlich ist.
11. Kolostralmilchprodukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens ca. 75 ng/ml IGF-1 enthält.
12. Kolostralmilchprodukt nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß es, bezogen auf das Rohkolostrum, ca. 50 bis 95%, insbesondere ca. 60 bis 95%, vorzugsweise ca. 70 bis 95%, besonders bevorzugt ca. 80 bis 95%, insbesondere bevorzugt wenigstens ca. 90% der im Rohkolostrum vorhandenen Wachstumsfaktoren enthält.
13. Kolostralmilchprodukt nach Anspruch 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es bovinen oder equinen Ursprungs ist.
14. Kolostralmilchprodukt nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß es in flüssiger, fester, pastöser oder in mikroverkapselter Form, insbesondere in Liposomen eingeschlossen, vorliegt.
15. Getränk, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kolostralmilchprodukt gemäß wenigstens einem der Ansprüche 10 bis 14 enthält.
16. Verwendung eines Kolostralmilchproduktes gemäß wenigstens einem der Ansprüche 10 bis 14 als Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel oder Kosmetikum.
17. Verwendung eines Kolostralmilchproduktes gemäß wenigstens einem der Ansprüche 10 bis 14 als Zusatz für Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel, Getränke oder Kosmetika.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Kolostralmilchprodukt als Bestandteil von Babynahrung, diätetischer Nahrung, klinischer Nahrung, insbesondere Sondennahrung, verwendet wird.
19. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Kolostralmilchprodukt als Arzneimittel zur wenigstens unterstützenden Behandlung von Neurodermitis, Wundheilung, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Allergien, insbesondere Heuschnupfen, Pollenallergien; Herzinfarkten und muskulären Erkrankungen während der Rehabilitation, verwendet wird.
20. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Kolostralmilchprodukt zum Muskelschutz, zur Abkürzung der muskulären Erholungsphase, insbesondere im Sportbereich, zur Prophylaxe und Unterstützung viraler, bakterieller und mykotischer Infektionen, sowie zur Stärkung des Immunsystems, verwendet wird.
21. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Kolostralmilchprodukt als Zusatz zu Backwaren, insbesondere energiehaltigen Riegeln, Müsliriegeln oder Powerbars, verwendet wird.

- Leerseite -